

prend la quantité totale d'unités de protéines PrP normales incluses dans les chaînes polymériques de différentes longueurs, et l'autre reflète le nombre de ces chaînes et, par conséquent, de toutes les terminaisons à activité catalytique.

La méthode présente l'intérêt que plusieurs termes s'annulent. Il ne reste que deux équations différentielles, qui décrivent la variation en fonction du temps des deux termes mentionnés précédemment. Les solutions sont constituées de la somme de deux fonctions exponentielles, où le temps apparaît comme exposant, une fois avec le signe plus et une fois avec le signe moins (voir l'encadré ci-contre).

L'une des fonctions représente un terme de croissance, l'autre un terme de dégradation. Ce dernier décrit l'établissement d'un état d'équilibre, où la quantité des chaînes de longueur donnée est constante. Au bout d'un certain temps, ce terme devient négligeable devant le terme de croissance. Le nombre de chaînes de polymères – et celui des prions pathogènes – augmente alors de façon exponentielle, tandis que le nombre de protéines PrP normales diminue.

Une durée d'incubation prolongée

Joanna Masel, à l'Université d'Oxford, a analysé en détail toutes les conclusions tirées de ce modèle et les a comparées à des données expérimentales. Ses résultats seront précieux pour les recherches en cours visant à diagnostiquer les maladies à prions à un stade toujours plus précoce. Ainsi la fixation d'un prion normal sur une chaîne et sa transformation en un prion pathogène durent à peu près un quart d'heure. Un prion pathogène contient un millier de sous-unités : son temps de formation sera d'une dizaine de jours (1 000 quarts d'heure). Selon diverses expériences, cette durée varie de 5 à 20 jours. Pour qu'un état d'équilibre s'établisse, il faut qu'une rupture de chaîne, en moyenne, se produise pendant ce temps. La demi-période pour la rupture en un point donné est d'environ 30 ans. Chaque chaîne présentant en moyenne 1 000 points de rupture possibles, il se produit dans l'ensemble de l'agrégat une rupture de chaîne environ tous les dix jours. La formation et la rupture des chaînes s'équilibrent, mais le

nombre de chaînes (et, par conséquent, d'extrémités de chaînes actives) augmente de façon exponentielle.

Une autre grandeur importante est le rapport entre la vitesse de formation et la vitesse d'élimination des prions pathogènes. D'après des mesures effectuées sur des animaux de laboratoire, les deux vitesses sont du même ordre de grandeur. Cela signifie que le matériel infectieux doit «se reproduire» sans cesse pour survivre. On ignore encore comment se fait l'élimination, mais les défenses immunitaires interviennent vraisemblablement, ainsi que d'autres mécanismes de dégradation ou d'inactivation des prions pathogènes. Le terme traduisant la dégradation est proportionnel à la quantité disponible de prions infectieux. De surcroît, seul

le substrat de la réaction, le prion normal à transformer, se déplace librement en solution et atteint une chaîne pathogène en croissance (schématiquement, on dit que cette réaction rapide est «contrôlée par la diffusion»). Les chaînes de prions pathogènes ne sont pas libres, mais fixées à des membranes : ainsi, une «unité infectieuse» serait bien constituée de 100 000 molécules de prions, mais les chaînes se rompraient dès qu'elles atteignent une longueur environ égale à 1 000 sous-unités. Les fragments restent dans le voisinage et se comportent comme des essaims coopératifs. Ils ne se dispersent qu'à partir du moment où ils se détachent de la membrane.

Ainsi, le matériau pathogène double au bout de plusieurs semaines,

La cinétique de la multiplication

Pour comprendre la multiplication des prions infectieux du point de vue mathématique, on doit prendre en compte l'ensemble des réactions pouvant conduire à une chaîne pathogène de longueur i , et évaluer la vitesse de formation de cette molécule. Certaines réactions, par exemple les défenses immunitaires, peuvent inactiver le mécanisme (a). La chaîne peut se rompre à n'importe quel endroit (b). Seuls les fragments d'une longueur minimale n restent infectieux. Enfin, la chaîne peut s'allonger grâce à la fixation d'une protéine PrP naturelle et de sa conversion en forme pathogène (c). Le métabolisme produit et dégrade des protéines PrP saines à des vitesses données, respectivement v_p et v_d .

Toutes ces réactions ont des constantes de vitesse spécifiques. On exprime le nombre total de chaînes (y) et le nombre total de

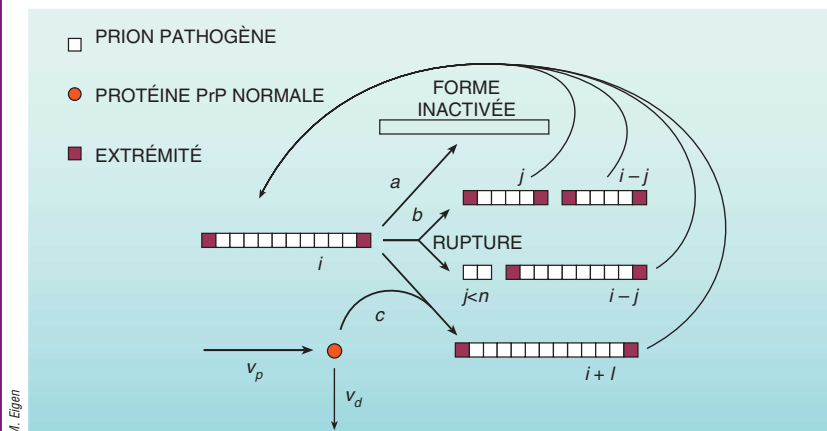
prions pathogènes qu'elles renferment (z) en fonction du temps et de la concentration en protéines PrP normales (x).

Ces termes sont liés par des équations différentielles. À l'équilibre de la réaction, la concentration en protéines PrP normales est considérée comme étant quasi constante, et l'on obtient les expressions de y et de z :

$$y(t) = A_2 e^{k_2 t} + A_1 e^{-k_1 t}$$

$$z(t) = B_2 e^{k_2 t} + B_1 e^{-k_1 t}$$

Ces deux solutions comprennent chacune un terme de croissance et un terme de dégradation. Ce dernier a une constante de temps ($-k_1$) négative : il s'établit un équilibre tel que la répartition des longueurs des chaînes reste constante. Au bout d'un certain temps, le terme de croissance l'emporte. Ces équations révèlent aussi que les prions infectieux se multiplient lentement.



Un prion pathogène peut soit être inactivé (a), soit se diviser (b). Progressivement, la longueur de la chaîne pathogène augmente (c), mais il s'établit un équilibre, où la répartition de la longueur des chaînes pathogènes reste quasi constante et où le nombre des prions pathogènes finit par l'emporter sur le nombre des prions inoffensifs.

et la multiplication d'un germe infectieux jusqu'à une concentration décelable par des méthodes d'analyse classiques requiert près d'une année. Malgré ces résultats, on s'interroge encore sur les phases initiale et terminale de l'infection, sur les modes d'infection, sur le temps qui s'écoule jusqu'à l'invasion du cerveau et de la moelle épinière, ainsi que sur la façon dont l'agent pathogène dégrade ces tissus dans la phase terminale.

Sensibilité des tests et dépistage précoce

Connaissant la cinétique de l'infection, on détermine le stade où l'on peut dépister la maladie. Plus le diagnostic sera précoce, plus efficace sera la lutte contre l'épidémie.

En raison de l'extrême lenteur de la multiplication des prions pathogènes, une méthode de dépistage plus sensible permet de diagnostiquer la maladie des mois, voire des années plus tôt. En 1994, nous avons décrit une méthode adaptée à la détection de très petites quantités de prions. Il s'agit de la spectroscopie de corrélation de fluorescence. La spectroscopie de fluorescence classique consiste

à marquer les molécules à détecter à l'aide d'un colorant qui devient fluorescent lorsqu'il est éclairé par une longueur d'onde caractéristique. On irradie l'ensemble de l'échantillon et l'on mesure l'intensité de la fluorescence, qui indique la concentration de la molécule fluorescente. Celle-ci doit toutefois être suffisamment élevée pour que le signal de fluorescence mesuré soit supérieur au bruit de fond. Cela requiert des concentrations supérieures à 10^{15} particules par litre.

Les nouvelles méthodes détectent des concentrations notablement inférieures. On n'analyse plus la totalité de l'échantillon, mais on dirige le rayon laser sur la plus petite surface possible, imposée par la longueur d'onde choisie. Dans notre cas, le volume analysé par le laser est inférieur au femtolitre (10^{-15} litre). Comme la concentration en molécules fluorescentes est infime et que le signal risque d'être noyé dans le bruit de fond, on n'enregistre plus le signal stationnaire pondéré en fonction du temps, mais on se «met à l'affût» et on attend qu'une molécule fluorescente pénètre dans le faisceau laser. La molécule n'y reste que quelques millisecondes, mais pendant ce temps elle

émet plusieurs milliers de photons. Cette salve de photons se distingue des photons isolés du bruit de fond.

Le dispositif de détection est constitué d'un microscope confocal à fluorescence et d'un ordinateur. Par cette méthode, on visualise des molécules une par une, de sorte que l'on détecte des concentrations extrêmement faibles, de l'ordre de la femtomole, ce qui correspond à environ un milliard de particules par litre.

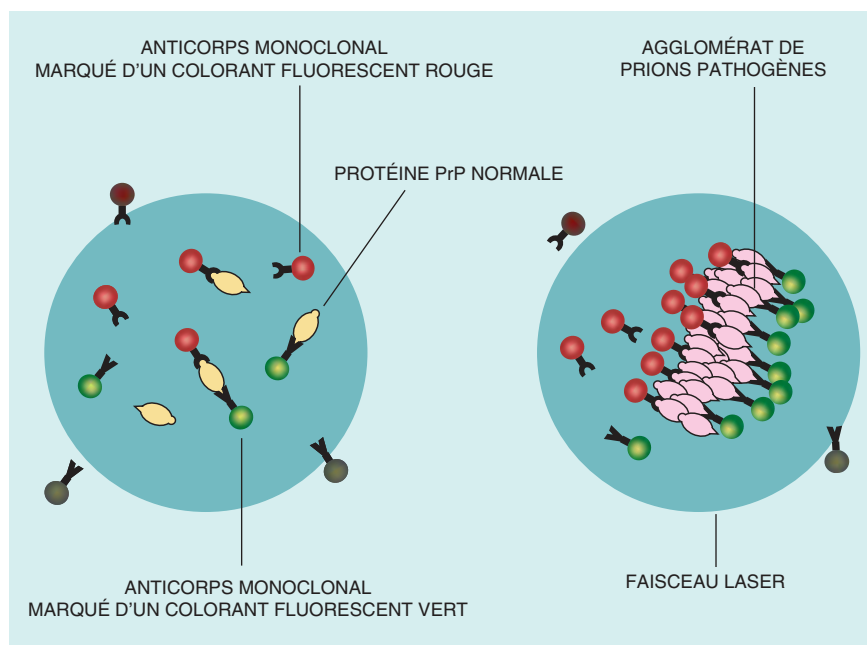
Cette méthode, dite d'autocorrélation, fonctionne avec un marqueur fluorescent lié à une substance qui se fixe avec une grande affinité sur le composé à détecter, apposant une sorte d'étiquette lumineuse. On utilise généralement des anticorps monoclonaux, qui se fixent spécifiquement sur des séquences spécifiques du prion normal. Le prion pathogène est un agrégat de protéines, constitué de nombreux prions normaux, de sorte qu'un grand nombre d'«étiquettes» peuvent s'y fixer.

On peut utiliser deux substances fluorescentes : dès qu'un agrégat pathogène pénètre dans le volume analysé, il émet simultanément un signal rouge et un signal vert, par exemple. Leur coïncidence est une preuve de la présence du prion infectieux. Bien qu'une protéine PrP normale puisse également fixer à la fois un marqueur rouge et un vert, elle ne forme pas d'agrégats de grande taille et ne produit qu'un signal très faible.

La SIFT (pour *Scanning for intensely fluorescent targets*, c'est-à-dire méthode de scannage des cibles très fluorescentes) est une méthode de détection de la fluorescence. Nous l'avons utilisée pour analyser le liquide céphalo-rachidien de personnes souffrant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob.

La sensibilité de cette méthode est 10 à 100 fois supérieure à celle des méthodes classiques de dépistage de l'encéphalopathie spongiforme bovine. La méthode autorise le dosage de l'agent pathogène dans les fluides corporels accessibles, par exemple le liquide céphalo-rachidien. En principe, on pourrait l'appliquer au dépistage de l'encéphalopathie spongiforme bovine chez les bovins vivants (bien que le prélèvement de liquide céphalo-rachidien soit compliqué et nécessite une anesthésie).

Les exigences en matière de recherche de l'agent de l'encéphalopathie spongiforme bovine sont dras-



3. UN MARQUAGE À L'AIDE DE DEUX COLORANTS FLUORESCENTS améliore la détection des prions pathogènes. La méthode (SIFT) utilise deux types d'anticorps qui se fixent spécifiquement sur deux sites différents des prions. L'un est marqué d'un colorant fluorescent rouge, l'autre d'un colorant fluorescent vert. Lorsqu'ils rencontrent un prion pathogène à longue chaîne, les anticorps fluorescents s'y fixent en de nombreux sites (à droite). La particule pathogène trahit sa présence en émettant une forte fluorescence verte et une intense fluorescence rouge lorsqu'elle est excitée par un faisceau laser adapté. Seuls quelques anticorps se fixent sur les protéines PrP normales, de sorte que ces dernières ne fournissent qu'un signal fluorescent très faible lorsqu'elles sont éclairées par le même faisceau laser (à gauche).

tiques. On ne doit pas se contenter d'une concentration en prions pathogènes inférieure à un seuil donné, on doit s'assurer que la viande est totalement exempte de matériel infectieux. On doit trouver comment interdire toute commercialisation de denrées alimentaires susceptibles de contenir des germes pathogènes.

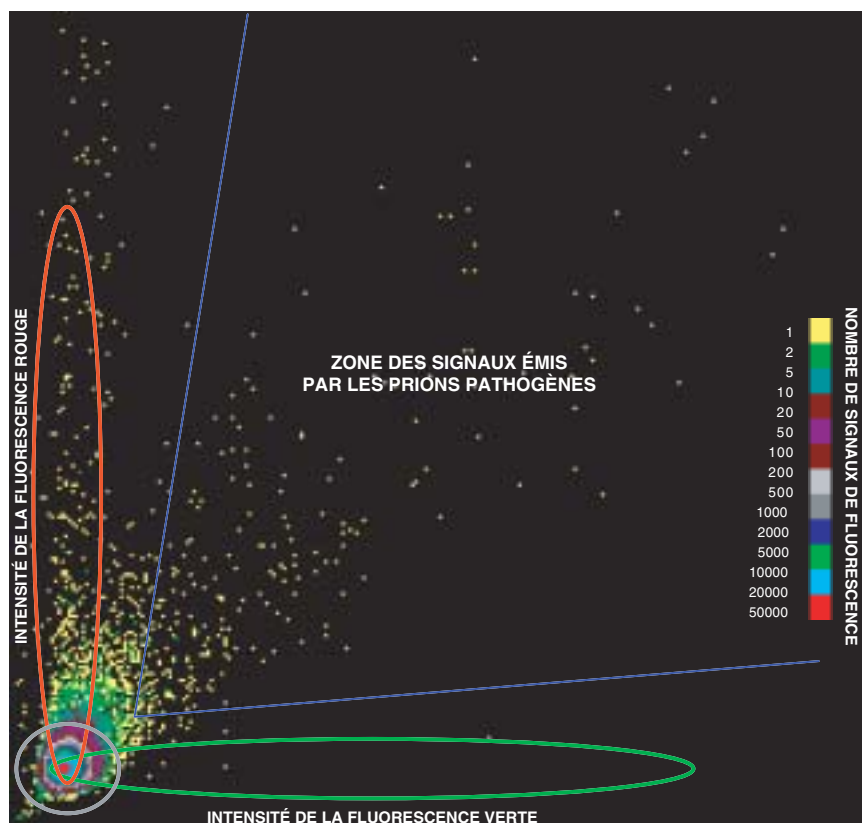
Or, toutes les méthodes de dépistage connues aujourd'hui présentent, certes, une sensibilité extrêmement élevée, mais elles ne détectent que des quantités de prions pathogènes très supérieures aux 100 000 sous-unités d'un germe infectieux. Les nouvelles méthodes, parfois 100 fois plus sensibles que les méthodes classiques n'améliorent guère la situation. Dès lors, comment peut-on débusquer les prions pathogènes parmi l'énorme quantité de particules propres à l'organisme?

La sécurité du consommateur

On pourrait essayer de multiplier artificiellement les germes présents jusqu'à ce que leur concentration dépasse le seuil de détection. Pour les virus et les bactéries, dont le pouvoir pathogène est inscrit dans leurs gènes, cela ne pose aucune difficulté, notamment grâce à la méthode d'amplification des gènes, la PCR. Il faut entre une seconde et une minute pour qu'une séquence caractéristique soit doublée. Pour un échantillon ne contenant qu'une seule séquence cible d'ADN, on obtient 30 réplifications en une demi-heure, soit environ un milliard (2^{30}) de copies.

Même si l'on disposait d'une méthode analogue pour les prions, une telle amplification nécessiterait environ un an, en raison de la cinétique décrite précédemment. Comment peut-on accélérer ces réactions *in vitro*? On pourrait, par exemple, exploiter le fait que les agrégats sont hydrophobes et se fixent préférentiellement sur les membranes. Il nous faudrait influencer sur la cinétique de façon à amplifier en peu de temps les traces infimes de prion pathogène. Ainsi pourrait-on dépister une infection dès qu'elle commence.

La question lancinante de la nature exacte du prion se pose à nouveau. L'agent infectieux n'est ni une protéine isolée ni un polymère défini de sous-unités protéiques. Il s'agit plutôt d'agrégats unidimensionnels de



4. AFIN D'ÉVALUER L'INTÉRÊT DE LA MÉTHODE SIFT pour la recherche de prions pathogènes chez l'homme, on a ajouté une quantité donnée d'agrégats de prions infectieux à du liquide céphalo-rachidien prélevé sur des personnes souffrant de troubles neurologiques qui n'étaient pas dus à une maladie à prions. Dans cette méthode, on utilise deux anticorps marqués par des colorants fluorescents (un rouge et un vert) et, lorsque la fluorescence est intense, on en déduit que le faisceau laser a éclairé un amas de molécules qui ont fixé l'un ou l'autre, ou les deux colorants. On a ainsi enregistré les signaux lumineux et leur intensité (sur l'axe vertical, la fluorescence rouge et sur l'axe horizontal, la fluorescence verte). On observe une majorité de signaux faibles produits par des anticorps marqués à l'aide d'un colorant fluorescent, qui correspondent à la détection de prions inoffensifs (en bas, à gauche). Au contraire, lorsqu'un agrégat de prions pathogènes ayant fixé un grand nombre d'anticorps fluorescents rouges et verts est éclairé par le faisceau laser, il émet une fluorescence intense (composée à parts quasi égales de rouge et de vert). Ces émissions intenses sont représentées par des points jaunes dans la zone supérieure droite (entre les deux lignes bleues). Les points à l'intérieur de l'ellipse rouge et de l'ellipse verte proviennent d'autres agrégats protéiques, qui fixent par hasard l'un des deux marqueurs fluorescents.

protéines, constitués de prions pathogènes et caractérisés par une longueur moyenne de chaîne. La taille de l'unité infectieuse ne dépend pas seulement de cette longueur moyenne. Les agrégats sont probablement plutôt fixés à des membranes, et seules les extrémités des chaînes sont infectieuses. Une seule chaîne de 100 000 sous-unités pathogènes a un pouvoir

infectieux 1 000 fois inférieur à la même quantité d'unités pathogènes réparties sur 1 000 fragments de chaînes d'une longueur moyenne de 100 unités. Le nombre des extrémités de chaînes «infectieuses» qui assurent la croissance exponentielle des unités pathogènes est un facteur clé des maladies spongiformes transmissibles.

Manfred EIGEN est directeur émérite du Département de cinétique biochimique de chimie et de biophysique de l'Institut Max Planck, à Göttingen.

J. MAZEL et al., *Quantifying the Kinetic Parameters of Prion Replication*, in *Biophysical Chemistry*, vol. 77, p. 139, 1999.

J. BIESCHKE et al., *Ultra-sensitive Detection*

of Pathological Prion Protein Aggregates by Dual-color Scanning for Intensely Fluorescent Targets (SIFT), in *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, p. 5468, 2000.

M. EIGEN, *Das Gen und der Mensch*, sous la direction de G. Gottschalk, éditions Wallstein Verlag, 2000.

Des cellules productrices de prions

DIDIER VILETTE

La fonction de la protéine PrP normale et sa transformation en prion pathogène seront précisées par l'étude de lignées de cellules qui produisent des prions.

La tremblante du mouton et de la chèvre est une encéphalopathie spongiforme transmissible, décrite depuis longtemps, et très répandue : elle touche les ovins et les caprins sur l'ensemble du globe à l'exception de l'Australie et de la Nouvelle-Zélande, réputées indemnes. En France, elle touche jusqu'à 10 pour cent des animaux de certains troupeaux. Ainsi, cette pathologie est un problème de santé animale et fait l'objet de recherches menées dans différents laboratoires de l'Institut national de recherche agronomique, l'INRA. De surcroît, la tremblante ovine est considérée comme le prototype des encéphalopathies spongiformes transmissibles naturelles. La maladie se propage naturellement comme une maladie infectieuse, contrairement aux encéphalopathies spongiformes transmises expérimentalement aux rongeurs. Les enseignements tirés de l'étude de la tremblante du mouton et de son agent pathogène sont précieux pour les recherches menées sur les souches naturelles responsables de l'encéphalopathie spongiforme bovine, ou maladie de la vache folle, ou de la maladie humaine de Creutzfeldt-Jakob.

Pour étudier la fonction de la protéine PrP normale et sa transformation en prion pathogène, nous essayé d'obtenir des cellules qui synthétiseraient à la demande des prions. Nous nous sommes fondés sur divers résultats expérimentaux établis par les équipes qui travaillent depuis plusieurs années sur les prions. Ainsi, nous savons aujourd'hui que la sensibilité de l'animal à la maladie dépend de l'expression du gène codant la protéine PrP normale : des souris transgéniques chez

qui cette protéine est surexprimée développent la maladie beaucoup plus rapidement que les autres souris. En outre, la protéine PrP normale intervient dans le franchissement de la barrière d'espèce : l'infection par des prions pathogènes provenant d'une autre espèce est, en général, bien plus rapide quand l'animal receveur synthétise la protéine PrP normale de l'espèce infectante. Ainsi, nous avons choisi de renforcer, par transfection, l'expression de la protéine PrP ovine normale dans différentes lignées cellulaires, qu'elles soient de mouton ou d'autres espèces, puis nous avons testé si elles assuraient la réplication des prions pathogènes ovins.

Dans un premier temps, nous avons tenté d'utiliser des lignées cellulaires provenant du système nerveux central de mouton (l'organe cible des prions pathogènes), mais, après la transfection, la protéine PrP ovine normale était peu surexprimée, et ces cellules se révélèrent être un piètre moyen de multiplier les prions. Avec nos collègues de l'équipe Infections à prions, à Jouy-en-Josas, nous avons alors mené des essais sur des lignées cellulaires issues d'autres espèces, et nous avons obtenu de bons résultats avec une lignée de cellules épithéliales de lapin. Nous avons placé le gène codant la protéine PrP ovine normale sous contrôle d'un promoteur inductible par les tétracyclines, c'est-à-dire qu'en agissant

sur le promoteur, on commande le moment de l'expression et la quantité de protéine produite. Ce gène ovine modifié a été réintroduit par transfection dans les cellules épithéliales de lapin. La lignée cellulaire correspondante a été nommée Rov. En l'absence de l'inducteur – la doxycycline –, le gène ne s'exprime pas et les cellules Rov ne produisent pas la protéine PrP ovine normale. En revanche, dès que l'on introduit de la doxycycline dans le milieu de culture, les cellules modifiées de lapin synthétisent la protéine ovine.

La deuxième étape consistait à vérifier que l'on pouvait aussi produire du prion ovine pathogène. Pour infecter les cellules Rov, on les fait incuber pendant quelques jours en présence d'un broyat de cerveau de mouton atteint de la maladie. Pour détecter si des prions ovins sont bien produits dans les cellules infectées, nous avons réalisé deux types de tests. Le plus simple consiste à détecter biochimiquement la présence de la protéine PrP anormale dans les cellules infectées. Pour ce faire, on extrait les protéines cellulaires, on fait agir une protéase pour dégrader la protéine PrP normale (seul le prion pathogène résiste aux protéases) et l'on recherche par des méthodes de laboratoire adaptées la présence de la forme pathogène. La deuxième « preuve » de la présence de prions pathogènes consiste à inoculer dans le cerveau d'animaux sains des extraits de nos cultures. Si l'animal meurt d'une encéphalopathie spongiforme, c'est bien que la culture cellulaire contenait l'agent infectieux.

La longueur de la période d'incubation des encéphalopathies spongiformes est l'une des difficultés des expériences menées sur les prions. Afin de se doter d'un modèle animal plus sensible aux prions ovins que les souris classiques, nous avons mis au point, avec Jean-Luc Vilotte, du laboratoire de Génétique biochimique et cytogénétique de l'INRA, des souris transgéniques qui expriment non plus la protéine PrP normale de souris, mais la protéine PrP normale de mouton. Nous avons obtenu des animaux pour lesquels la période d'incubation a été réduite d'un an (passant de 14 mois à 2 mois), quand elles sont infectées par le prion ovine.

Grâce à notre modèle de souris transgéniques, nous avons montré que les cellules Rov assurent une production stable des prions ovins pathogènes : toutes les souris transgéniques inoculées avec les cultures infectées succombent d'une encéphalopathie spongiforme. Les concentrations infectieuses obtenues après multiplication de ces prions en culture sont comparables à celles que l'on obtient chez l'animal. De plus, nous avons vérifié qu'en l'absence d'expression de la protéine PrP normale, les prions pathogènes ne sont pas produits.

Sur cette culture de cellules épithéliales de lapin, certaines cellules (en bleu) ne produisent pas de prions pathogènes de mouton, mais d'autres (en marron) en synthétisent.

Oliver Andreoletti